

STABILIZATION OF ANTIBODY, AQUEOUS COMPOSITION AND COSMETIC

Publication number: JP5178719

Publication date: 1993-07-20

Inventor: UCHIWA HIDEYO; OGAWA YASUKO; MURAKAMI
UMEJI; SUGIMOTO KENICHI; MINAMINO HIROMI

Applicant: KANEBO LTD

Classification:

- international: **A61K39/395; A61K39/395;** (IPC1-7): A61K7/00;
A61K7/06; A61K39/395

- european:

Application number: JP19910358807 19911226

Priority number(s): JP19910358807 19911226

Report a data error here

Abstract of JP5178719

PURPOSE:To obtain an antibody-containing aqueous composition resistant to inactivation or agglomeration and precipitation of antibody even in the storage at a high temperature or in an unstable solvent by adding an aminopolycarboxylic acid derivative. **CONSTITUTION:**An aqueous composition containing an antibody is incorporated with 0.0005-50mg, preferably 0.002-10mg (based on 1ml of the aqueous composition) of an aminopolycarboxylic acid derivative such as ethylenediaminetetraacetic acid, glycol ether diaminetetraacetic acid, trans-1,2- cyclohexanediamine tetraacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid, nitrilotriacetic acid or their salts. The antigen of the above antibody is e.g. various proteins, hormones, cancer-originated antigens, bacterium-originated antigens or immunoglobulins and the content of the antibody in the aqueous composition is 0.001-150mg/ml, preferably 0.01-10mg/ml. The effect of the present invention is remarkable in the case of an aqueous composition containing an alcohol and a surfactant, especially a cationic surfactant.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-178719

(43)公開日 平成5年(1993)7月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 7/00	M	8615-4C		
	K	8615-4C		
	C	8615-4C		
7/06		8615-4C		
39/395	A	8413-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 4(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-358807	(71)出願人	000000952 鐘紡株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(22)出願日	平成3年(1991)12月26日	(72)発明者	打和 秀世 神奈川県小田原市久野461
		(72)発明者	小川 靖子 神奈川県横浜市栄区若竹町34番13号
		(72)発明者	村上 梅司 神奈川県中郡二宮町二宮741番地の1
		(72)発明者	杉本 憲一 神奈川県小田原市西酒匂2丁目10番14-106号
		(72)発明者	南野 博美 神奈川県小田原市蓮正寺470番地200

(54)【発明の名称】 抗体の安定化方法及び水性組成物ならびに化粧料

(57)【要約】

【構成】 E D T A を添加することを特徴とする抗体の安定化方法、及びE D T A を含有する抗体含有水性組成物または毛髪化粧料。

【効果】 アルコールやカチオン界面活性剤の存在下でも安定な、抗体含有水溶液を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノポリカルボン酸誘導体を添加することを特徴とする抗体の安定化方法。

【請求項2】 抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含有することを特徴とする水性組成物。

【請求項3】 抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項4】 抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含有することを特徴とする毛髪化粧料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗体の安定化方法に関し、また抗体とアミノポリカルボン酸誘導体を含有せしめた水性組成物及び化粧料に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで蛋白性の生理活性物質である抗体の用途としては、特に伝染病の予防又は治療、ホルモン量の調節、並びに腫瘍の部位検出または治療等の医薬品、又は特定物質の定量、診断の試薬等が知られている。また近年化粧品への応用として、虫歯や歯周病の原因菌に対する抗体を用いた口腔用品、あるいはニキビの原因菌に対する抗体を用いた化粧料、あるいは毛髪に対する抗体を用いた化粧料が試みられている。

【0003】これらの用途では、抗体水溶液を、活性および抗体分子の物理的状态に関して、十分に長い間安定した状態に保つことが必要になる。抗体水溶液が不安定であると失活したり、集塊が形成され徐々に抗体の沈降が生じる。その結果、製品の一定した品質が保証されなくなるという、いずれの商品形態にも許されない事態がおこる。

【0004】特に蛋白性の生理活性物質である抗体は、高温保存時において失活または変性が起こりやすく、実用上の障害となっていた。実際の液状医薬品免疫グロブリン製剤は、安定化のためにアミノ酢酸あるいはまた塩化ナトリウム等を添加しているが、それだけでは不十分であり、10℃以下の低温で保存しなければならない。

【0005】また化粧料の場合、かかる特性からその水溶液にはアルコール等の有機溶媒または界面活性剤が配合されているため、これら不安定溶媒中での安定化を図らなければならない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的とするところは、抗体の安定化方法および、高温保存下又は不安定溶媒中でも抗体の失活または集塊沈降のない、安定な抗体含有水性組成物及び化粧料を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上述の目的は、アミノポリカルボン酸誘導体を添加することを特徴とする抗体の安定化方法、抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含

有することを特徴とする水性組成物、抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含有することを特徴とする化粧料、及び抗体及びアミノポリカルボン酸誘導体を含有することを特徴とする毛髪化粧料によって達成される。

【0008】以下、本発明について詳細に説明する。本発明において用いられるアミノポリカルボン酸誘導体としては、エチレンジアミン四酢酸(EDTAと略記)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTAと略記)、トランス-1,2-シクロヘキサレンジアミン四酢酸(CyDTAと略記)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPAと略記)、トリエチレントトラミン六酢酸(TTHAと略記)、ニトリロ三酢酸(NTAと略記)およびそれらの塩等が挙げられる。

【0009】本発明におけるアミノポリカルボン酸誘導体の使用量は、水性組成物1ml当たり約0.0005~50mgの範囲が好ましく、更に好ましくは水性組成物1ml当たり0.002~10mgである。

【0010】本発明において用いられる抗体の抗原は、各種の蛋白質、ホルモン、癌由来抗原、ウイルス由来抗原、細菌由来抗原、あるいは免疫グロブリン等が挙げられる。

【0011】蛋白質としては、例えば動物の毛髪、体毛、羽毛、あるいは爪等から得られるケラチン型中間径フィラメント構成蛋白質、毛髪のキューティクル抽出蛋白質等が挙げられる。

【0012】ケラチン型中間径フィラメント構成蛋白質(以下ケラチンと略記する。)は、上記原料中のケラチンのジスルフィド結合を、還元あるいは酸化処理により開裂し、可溶化させ抽出することができる。

【0013】還元処理の場合、予めアルカリ条件化で可溶化助剤として種々の変性剤、例えば尿素、塩酸グアニジン等を加えて可溶化させる。これらから濾過または遠心操作により不溶物質を取り除くことにより、ケラチンを主成分とする抗原を得ることができる。より好ましくは透析操作などにより、変性剤を始めとする低分子不純物を適宜減量あるいは除去する操作を行い抗原とする。このときケラチンを不溶化させて凝集物とし、抗原としてもよい。また、上記ケラチンのスルフヒドリル基にヨード酢酸を付加せしめ、カルボキシメチル化反応などを行うことにより、水可溶性のケラチンを主成分とする抗原を得ることもできる。この場合もより好ましくは透析操作などにより、低分子不純物を除く操作を行い抗原とする。

【0014】またこの様にして得られた抗原から更にケラチンをゲル濾過法あるいは等電点沈澱法あるいはまた亜鉛塩添加等により分画精製したものを抗原としてもよい。

【0015】本発明において用いられる抗体としては、例えば上記抗原を免疫した動物の乳(常乳あるいは初乳)、または血清、または卵黄等から常法によって採取

された抗体（ポリクローナル抗体）が挙げられる。また、細胞融合によって不死化したB-リンパ球から得られるモノクローナル抗体や、トリオマ（trioma）またはカドロマ（quadroma）から得られる二価のモノクローナル抗体でもよい。更に組換えDNA技術によって得られるモノクローナル抗体またはその断片ペプチドであってもよい。

【0016】乳からの免疫グロブリンの取得は、公知の方法に従って実施できる〔Archives of Biochemistry and Biophysics, 108, 230, (1964) / The Journal of Immunology, 103, 334, (1969) / Biochimica Et Bio-physica Acta, 181, 381, (1969) / Journal of Dairy Science, 55, 151, (1972) / Journal of immunology, 118, 461, (1977)〕。

【0017】例えば、脱脂した乳から酸処理によりカゼインを除去し、乳清を分取し粗精製免疫グロブリンを得る。必要に応じて塩析操作あるいは陰イオン交換体（例えばDEAE-セルロース、DEAE-セファロース、QAE-セファデックス）を用いたイオン交換クロマトグラフィー操作あるいはゲル濾過担体（例えばセファロースS-300、セファデックスG-200）を用いたゲル濾過クロマトグラフィー操作を、単独あるいは組み合わせることで精製することもできる。更にケラチンを結合させた担体（例えばアフィゲル15、CH-セファロース4B）を用いたアフィニティークロマトグラフィー操作を行い特異的に抗体を精製することもできる。

【0018】以上の様にして得られる抗体は、精製されたものが好ましいが、未精製のものでも良い。

【0019】また、本発明の抗体は、酵素あるいは色素等を修飾結合させたものであっても良い。

【0020】本発明における抗体の含有量は、水性組成物1ml当たり約0.001~150mgの範囲が好ましく、更に好ましくは0.01~10mg/ml（全組成物）である。

【0021】また水性組成物のpHは4~10が好ましく、更に好ましくは5.0~8.5である。

【0022】本発明の水性組成物としては、例えばシャンプー、リンス、ヘアトリートメント、ヘアトリートメント、パーマメントウェーブ剤、ヘアカラー剤等の毛髪化粧料、洗顔化粧料、口腔化粧料、基礎化粧料、メイクアップ化粧料等の化粧料、また、医薬品、診断薬、検査薬、分析用試薬等が挙げられる。

【0023】本発明の水性組成物の成分としては、各々の用途での通常の成分、例えば、pH調整用等の無機塩、油性成分、界面活性剤、保湿剤、アルコール、増粘剤、防腐剤、殺菌剤、紫外線吸収剤、色剤、酸化染料、香料、甘味剤等が含まれても良く、その含有量も形状に応じて異なるが、本発明は特に、アルコールや界面活性

剤、中でもカチオン界面活性剤を含む水性組成物の場合に著しく効果を発揮する。

【0024】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれによりなんら制限されるものではない。尚抗体の力価は、ELISAにより求め、分子量分布はG3000SWゲル濾過カラムを用いたHPLCにて分析した。以下に記載の配合量は重量%である。

【0025】実施例1

（抗原の調製）男性の正常毛髪5gと女性の正常毛髪5gとを混合し、2%ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム（3E.O.）水溶液にて洗浄後、8M尿素、0.2M 2-メルカプトエタノール含有0.2Mトリス塩酸緩衝液（pH9.2）2.5リットルに加え、50℃窒素バブリング下1時間攪拌し、これをテフロンホモジナイザーを用いて磨り潰した。更にこの操作を繰り返し、10,000×gで30分間遠心して不溶物を除き、毛髪ケラチン抗原を抽出した。これに200gのヨード酢酸（予め400gのトリスを溶かした溶液760mlに溶かす）溶液を加え、室温遮光下で1時間攪拌反応させた。7mlの2-メルカプトエタノールを加えて反応を止め、十分な水に対して透析し5μmのフィルターを通し、不溶物を除去し毛髪ケラチン抗原溶液を得た（6リットル）。更にこの液4部に0.5M酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.2）1部を添加し（pH4.2になるように酢酸で調整）、毛髪ケラチンを等電点沈澱させた。1000×gで10分間遠心し、上清部を除き、沈澱部を集めた。生理食塩水にて溶解させ、0.2μmのフィルターを通して除菌し、更に限外濾過膜にて濃縮して精製毛髪ケラチン抗原を得た（蛋白質として2.6g）。

【0026】（牛の免疫化）この精製毛髪ケラチン抗原溶液を生理食塩水にて蛋白質濃度20mg/mlに調整し、その溶液とフロイント完全アジュバントを1:1の容量割合で混合して油中水型（以下W/O型と略記する。）のエマルジョンとした。得られたエマルジョンを出産2か月前の妊娠ホルスタイン牛2頭の首に皮下投与した（1頭には、1ml:抗原量10mg/頭、もう1頭には、5ml:抗原量50mg/頭を投与。）。その後10日間隔で、フロイント不完全アジュバントで作成したそれぞれ前回と同量の抗原を含んだエマルジョンを皮下あるいは筋注にて投与し免疫化した（1~3回目；皮下投与、4~5回目；筋注）。

【0027】（抗体の採取）出産直後より3日間初乳を補集した。クリームセパレーターにて脂肪層を除き、抗体を得た。

【0028】（抗体の精製）更にこの2頭の脱脂乳を混合し、以下のように分画精製を行った。脱脂乳に0.1N塩酸を添加してpH4.5にしカゼインを沈澱させ、濾布にて荒く沈澱を除き、2500×gの連続遠心操作

にて上清を得た。中和した後33%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、抗体を塩析させた。2500×gの連続遠心操作にて沈澱部を集め、生理リン酸緩衝液にて溶解し、この硫酸塩析操作を繰り返した。10mMリン酸緩衝液(pH7.5)にて透析し、同緩衝液にて平衡化した2リットルのDEAEセルロースカラムに5回に分けてアブライした。50mM塩化ナトリウム含有同緩衝液にて抗体を溶出させ、この画分を集めた(抗体として200g)。この画分の20g蛋白質分を硫酸塩析にて濃縮し、5回に分けてPBSにて平衡化したセフ

10
ァクリルS-300カラム(5×90cm)にアブラ*

*イし、主ピークを集め精製抗体を得た(抗体として15g回収)。

【0029】上記抗体を用いて、1mg/mlの抗体水溶液を調製し、安定化特性を試験する物質を種々の量で添加した。水溶液としては、防腐剤として0.02%アジ化ナトリウムを含む20mM磷酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を用いた。各溶液を60℃で1週間保存し、力価及び外観を評価した。結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

試験物質	評価(60℃1週間後)		
	添加量	外観	残存力価
EDTA	0.2%	変化なし	74%
EGTA	0.2%	変化なし	73%
NTA	0.2%	変化なし	70%
グリシン	1.0%	沈澱物を生ずる	38%
NaCl	1.0%	沈澱物を生ずる	54%
ソルビトール	1.0%	沈澱物を生ずる	53%
デキストラン40	1.0%	沈澱物を生ずる	32%
ゼラチン	1.0%	沈澱物を生ずる	27%
対照(無添加)		沈澱物を生ずる	40%

【0031】表1から明らかなように、EDTA、EGTA、NTAのようなアミノポリカルボン酸誘導体添加により、蛋白光の出現及び沈澱を抑制し、力価の低下を抑える等の抗体の安定化効果が認められた。尚経時変化後のEDTA添加試料のIgG単量体量をHPLCにて調べたところ経時変化変化前と同様90%以上であった。

【0032】実施例2

実施例1の抗体を用いて1mg/mlの抗体水溶液を調

30 製し、EDTA-2ナトリウムとクエン酸ナトリウムを種々の量で添加した。水溶液としては、防腐剤として0.2%安息香酸ナトリウムを含む20mM磷酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を用いた。各溶液を40℃で1カ月間保存し、力価及び外観を評価した。結果を表2に示す。

【0033】

【表2】

試験物質	評価（40℃1カ月間後）		
	添加量	外観	残存力価
EDTA-Na	0.3%	変化なし	100%
	0.1%	変化なし	98%
	0.02%	変化なし	83%
クエン酸Na	1.0%	変化なし	70%
	0.3%	変化なし	67%
対照（無添加）		変化なし	65%

【0034】表2から明らかなように、40℃1カ月間の長期経時変化においてもEDTAのようなアミノポリカルボン酸誘導体添加により、抗体の顕著な安定化効果が認められた。尚経時変化後のEDTA添加試料のIgG単量体重をHPLCにて調べたところ経時変化前と同様90%以上であった。一方クエン酸ナトリウムの様な一般的な有機酸塩では、抗体の顕著な安定化効果は認められなかった。

【0035】実施例3

アルコールまたは界面活性剤含有水溶液中での抗体の安*

* 定化を試みた。10%エタノールまたは2%塩化ステアリルトリメチルアンモニウム（カチオン界面活性剤）を配合した、0.2%安息香酸ナトリウム水溶液含有20mM燐酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に、実施例1の抗体1mg/mlとなるよう配合した。EDTA-2ナトリウムとクエン酸ナトリウムを種々の量で添加し、40℃1カ月間維持し、力価及び外観を評価した。結果を表3に示す。

【0036】

【表3】

10%エタノール配合水溶液

試験物質	評価（40℃1カ月間後）		
	添加量	外観	残存力価
EDTA-Na	0.3%	変化なし	100%
	0.1%	変化なし	98%
	0.02%	変化なし	88%
クエン酸Na	1.0%	変化なし	70%
	0.3%	変化なし	70%
対照（無添加）		変化なし	65%

2%カチオン界面活性剤配合水溶液

試験物質	評価（40℃1カ月間後）		
	添加量	外観	残存力価
EDTA-Na	0.3%	変化なし	66%
	0.1%	変化なし	50%
クエン酸Na	0.3%	変化なし	30%
対照（無添加）		変化なし	33%

【0037】表3から明らかなように、アルコールまたは界面活性剤含有水溶液においてもEDTAのようなアミノポリカルボン酸誘導体添加により、抗体の顕著な安定化効果が認められた。尚経時変化後のEDTA添加試料のIgG単量体重をHPLCにて調べたところ経時変化前と同様90%以上であった。一方クエン酸の様な一般的な有機酸では、抗体の顕著な安定化効果は認められ*

*なかった。

【0038】実施例4

ヘアーリンス

下記の成分を常法によって混合して、ヘアーリンスを調製した。

【0039】

【表4】

成分	重量%
塩化ステアリル	
トリメチルアンモニウム	3.0
セタノール	2.0
モノステアリン酸グリセリン	1.5
1,3-ブチレングリコール	5.0
流動パラフィン	2.0
EDTA	1.0
色素	適量
香料	適量
抗体（実施例1の抗体）	0.1
精製水	残余

この抗体含有ヘアーリンスは室温で少なくとも1か月は安定であった。

【0040】実施例5

ヘアートリートメント

下記の成分を常法によって混合して、ヘアートリートメントを調製した。

30 【0041】

【表5】

成分	重量%
塩化ステアリル	
トリメチルアンモニウム	3.0
セタノール	5.0
モノステアリン酸グリセリン	2.0
プロピレングリコール	6.0
キサンタンガム	0.3
EDTA	0.3
色素	適量
香料	適量
抗体（実施例1の抗体）	0.3
精製水	残余

この抗体含有ヘアートリートメントは室温で少なくとも1か月は安定であった。

【0042】実施例6
ヘアートニック

* 下記の成分を常法によって混合して、ヘアートニックを調製した。

【0043】
【表6】

成分	重量%
ビオゾール	0.1
サルチル酸	0.2
L-メントール	0.2
塩化カルプロニウム	0.5
エタノール	10.0
EDTA	0.02
香料	適量
抗体（実施例1の抗体）	0.05
精製水	残余

この抗体含有ヘアートニックは室温で少なくとも1か月は安定であった。

【0044】

【発明の効果】本発明により、抗体の安定化方法および、抗体の力価および外観が安定な抗体含有水性組成物並びに化粧料が提供される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

A 61 K 39/395

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

M 8413-4C